

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND 107049574

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 03 OCT 2000

WIPO

PCT

DE 00/02748

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

4

Aktenzeichen:

199 41 447.5

Anmeldetag:

31. August 1999

Anmelder/Inhaber:november AG Novus Medicatus Bertling Gesellschaft
für Molekulare Medizin, Erlangen/DE**Bezeichnung:**Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerin-
nungsstatus**Priorität:**

14.08.1999 DE 199 37 654.9

IPC:

G 01 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. September 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag

Nietiedt



Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus.

5

Die Bestimmung des Blutgerinnungsstatus kann indirekt durch Ermittlung der Prothrombinkonzentration in menschlichen Körperflüssigkeiten erfolgen. Bei Prothrombin handelt es sich um ein Protein, welches vorwiegend im Plasma des menschlichen Bluts vorkommt. Dieses Protein ist durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbar. Prothrombin ist mitverantwortlich für die Blutgerinnung. Es wandelt lösliches Fibrinogen in unlösliches Fibrin um.

15 Die durch Prothrombin induzierte Umwandlung des Fibrinogens erfolgt nur dann, wenn Prothrombin in natürlicher carboxylierter Form vorliegt. Die Carboxylierung erfolgt in der Leber durch eine Carboxylase unter Bindung des Co-Faktors Vitamin K. Die Aktivität der Carboxylase ist von der Konzentration an Vitamin K abhängig. Wenn die Vitamin-K-Bindungsstelle der Carboxylase blockiert wird, ist sie nicht aktiv. Es entsteht dann eine abnormale nicht carboxylierte Form des Prothrombins, welche nicht gerinnungsaktiv ist. Die Wirkung oral verabreichter Anticoagulantien beruht auf der 20 Wirkung der Blockierung der Vitamin K Bindungsstellen der Carboxylase.

Beim gesunden Menschen liegt das Prothrombin in natürlicher, d.h. carboxylierter, Form vor. Die Carboxylierung wird durch 30 Vitamin-K als Co-Faktor bewirkt. Bei kranken Menschen, insbesondere bei Menschen mit Leberschäden, oder bei Zugabe

von Antikoagulantien, kommt Prothrombin auch in der abnormalen Form vor.

Das carboxylierte Prothrombin bewirkt eine Gerinnung nur dann, wenn zuvor Ca^{2+} -Ionen gebunden werden. Nur dann ist das carboxylierte Prothrombin in der Lage, an die Membranen der Blutplättchen zu binden und eine Gerinnung zu bewirken. Nur die carboxylierte Form des Prothrombins kann Calcium binden. Somit läßt der Gehalt an carboxyliertem Prothrombin auf den Blutgerinnungsstatus schließen.

Aus der US 4,769,320 ist ein Verfahren bekannt, bei dem die Ermittlung des Gehalts an carboxyliertem Prothrombin unter Verwendung spezifischer Antikörper für Prothrombin mittels Immunoassay erfolgt.

Aus der US 5,352,712 ist ein monoklonaler Antikörper bekannt, der spezifisch für nicht-carboxyliertes Prothrombin ist. Unter Verwendung dieses Antikörpers läßt sich mittels Immunoassay die Konzentration an nicht-carboxyliertem Prothrombin ermitteln. Auch damit ist eine Aussage über den Blutgerinnungsstatus möglich.

Nach dem Stand der Technik tritt das Problem auf, daß das zu analysierende Probenmaterial nicht immer unmittelbar nach der Entnahme der Probe analysiert wird. Durch die Versendung des Probenmaterials vergehen mitunter 1 bis 2 Tage. Die meisten der an der Blutgerinnung beteiligten Faktoren sind hoch empfindlich und schnell inaktiv. Es wird während dieser Zeit wird u.a. sowohl carboxyliertes als auch nicht-carboxyliertes Prothrombin in der Probe abgebaut. Einer Verfälschung der Ergebnisse des Blutgerinnungsstatus ist die Folge.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere die Genauigkeit der Ermittlung des Blutgerinnungsstatus mittels der Bestimmung des Prothrombingehalts erhöht werden.

5

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 2 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 15.

10 Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten vorgesehen:

15 a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

20 b1) Ermittlung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Protein unter Verwendung eines ersten Antikörpers und Ermittlung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines zweiten Antikörpers,

25 c) Bildung eines ersten Quotienten aus erster und zweiter Konzentration und

d) Korrelation des Quotienten mit dem Blutgerinnungsstatus.

30 Nach einer weiteren Variante ist ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten vorgesehen:

4

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

5 b2) Ermittlung einer Gesamtkonzentration an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines dritten Antikörpers und Ermittlung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines zweiten Antikörpers,

10

c1) Errechnung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Protein gemäß folgender Beziehung:

$$C3 - C2 = C1$$

15

und Bildung eines ersten Quotienten aus erster und zweiter Konzentration

oder

20

c2) Bildung eines zweiten Quotienten aus dritter und erster Konzentration und

25

d) Korrelation des ersten bzw. zweiten Quotienten mit dem Blutgerinnungsstatus.

30

Unter einem durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbaren Protein wird ein Protein verstanden, das in Abhängigkeit des Blutgerinnungsstatus anteilig sowohl caboxylierter als auch in decarboxylierter Form vorliegen kann.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, auf der Basis des Gehalts an modifizierbarem Protein den Blutgerinnungsstatus genau zu ermitteln. Die Betrachtung sowohl des Gehalts an carboxyliertem Protein als auch des Gehalts an decarboxyliertem Protein und das Inbeziehungsetzen der beiden vorgenannten Proteingehalte werden Fehler bei der Bestimmung des Blutgerinnungsstatus minimiert.

Bei der Körperflüssigkeit kann es sich zweckmäßigerweise um Plasma, Blut, Speichel, Urin oder dgl. handeln. Geeignet sind grundsätzlich alle Körperflüssigkeiten, in der das modifizierbare Protein in einem Gehalt enthalten ist, der eine Messung ermöglicht.

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal der Erfindung erfolgt die Bestimmung der ersten, zweiten und/oder dritten Konzentration mittels eines enzym- oder fluoreszenz-immunologischen Verfahrens. Dabei kann als enzym-immunologisches Verfahren ELISA oder Strip-Assay verwendet werden.

Es ist aber auch möglich, daß die erste, zweite und/oder dritte Konzentration und/oder der erste bzw. zweite Quotient mittels einer Farbreaktion oder Fluoreszenzdetektion ermittelt wird. Damit ist eine besonders schnelle und einfache Ermittlung des Blutgerinnungsstatus möglich.

Bei dem ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbaren Protein handelt es sich vorzugsweise um Prothrombin, Nephrocalcin oder Osteocalcin. Es ist auch denkbar zur Bestimmung des Blutgerinnungsstatus andere Proteine benutzen, die von einer Vitamin-K abhängigen

6

Carboxylase carboxyliert werden und ebenfalls mittels oral verabreichbarer Anticoagulantien beeinflussbar sind. Nephrocalcin ist z.B. im Urin nachweisbar. Es muß bei Benutzung dieses Proteins kein Blut entnommen werden. Das
5 bedeutet für Patienten, deren Blutgerinnungsstatus laufend überwacht werden muß, eine erhebliche Erleichterung.

Es ist ferner ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, wobei zur enzym-immunologischen
10 Bestimmung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Protein ein erster Antikörper enthalten ist.

Zweckmäßigerweise kann zur Bestimmung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Protein ein zweiter
15 Antikörper enthalten sein.

Es kann sich beim ersten und zweiten Antikörper um nach dem Stand der Technik bekannte Antikörper handeln. Solche Antikörper sind z.B. aus der US 5,252,712 und US 4,769,320
20 bekannt, deren Inhalt hiermit in die Beschreibung einbezogen wird.

Der Kit kann zweckmäßigerweise zur Bestimmung einer Gesamtkonzentration an carboxyliertem und decarboxyliertem
25 Protein einen dritten Antikörper enthalten. Auch dabei kann es sich um einen nach dem Stand der Technik bekannten Antikörper handeln.

Der erste und der zweite Antikörper können jeweils auf einem
30 separaten Feld eines Teststreifens aufgenommen sein. Das ermöglicht eine besonders einfache Ermittlung des jeweiligen Gehalts z.B. mittels Farbreaktion.

08-390666-Nwe november 45

7

Der dritte Antikörper kann auf einem Feld eines weiteren Teststreifens aufgenommen sein.

5 Zur Vervollständigung des Kits kann jeweils ein zum ersten und zweiten Antikörper korrespondierendes Anti-Protein-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Protein-Fluoreszenz-Farbstoff-Konjugat enthalten sein. Vorteilhafterweise kann auch ein zum dritten Antikörper korrespondierendes Anti-Protein-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Protein-Farbstoff-Konjugat enthalten sein.

10

Bei dem Protein handelt es sich vorzugsweise um Prothrombin, Nephrocalein oder Osteocalcin.

15 Nachfolgend wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand der Zeichnung erläutert: Es zeigen

Fig. 1 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit cPT/dcPT,

20 Fig. 2 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit cdPT/cPT und

Fig. 3 die Korrelation des Blutgerinnungsstatus mit dcPT.

25 In Fig. 1 ist der Quotient aus der Konzentration von carboxyliertem und decarboxyliertem Prothrombin über dem Blutgerinnungsstatus INR aufgetragen. Die Konzentration ist hier als OD-Wert gemessen. Bei einem ermittelten Quotienten von 0,5 ergibt sich ein Blutgerinnungsstatus INR von 3,8.

30

In Fig. 2 ist der Quotient aus decarboxyliertem mit carboxyliertem Prothrombin über dem Blutgerinnungsstatus

aufgetragen. Es ist ersichtlich, daß der Quotienten hier besonders gut mit dem Blutgerinnungsstatus INR korreliert.

Fig. 3 zeigt die nach dem Stand der Technik bekannte Korrelation von dcPT mit dem Blutgerinnungsstatus INR. Diese verändert sich mit zunehmendem Alter der Proben.

Beispiel:

Für Serienmessungen besonders geeignet ist der sogenannten Sandwich-ELISA.

10

a) Probenvorbereitung:

Zu deren Durchführung werden die Kavitäten von Mikrotiterplatten (z.B. Maxisorb, NUNC) über Nacht bei 4°C mit je 50µl Capture-Antikörper (10µg/ml in Carbonatpuffer) beschichtet. Die Platten werden 3mal mit PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen werden die Platten 1h bei Zimmertemperatur mit 50µl 1% BSA in PBS pro Kavität geblockt. Die Platten werden dann 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen.

20

Anschließend werden die Antigene wie folgt aufgetragen (50µl/Kavität):

- Kalibrierplasmen, 1:50 verdünnt in PBS/0,1% BSA
- 25 Normalplasma, 1:50 verdünnt in PBS/0,1% BSA
- Patientenplasma, 1:50 verdünnt in PBS/0,1% BSA
- Prothrombindefizientes Plasma (negative Kontrolle)

Die Platten werden 1h bei Zimmertemperatur inkubiert und anschließend 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen. Es werden 50µl/Kavität Kaninchen anti Gesamt-Prothrombin (10µg/ml) zugefügt. Dann werden die Platten 1h bei Zimmertemperatur

inkubiert und anschließend 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen. Es werden 50µl/Kavität Ziege anti Kaninchen Antikörper, Biotin-konjugiert, (Dianova, 1:20000 in PBS/0,1% BSA) zugefügt. Die Platten werden 1h bei Zimmertemperatur
 5 inkubiert und dann 3mal mit PBS/0,05%Tween 20 gewaschen.

Es werden 50µl/Kavität Streptavidin-Peroxydase-Konjugat (Roche Diagnostics, 1:1000 in Konjugatpuffer) zugefügt. Die Platten werden 1h bei Zimmertemperatur inkubiert und
 10 anschließend 3mal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen.

Dann werden 50µl/Kavität ABTS-Lösung (Roche Diagnostics, 1mg/ml) zugefügt, und die Platten werden ½h - 1h bei Zimmertemperatur inkubiert. Schließlich werden die Platten im
 15 ELISA-Reader gemessen.

b) Auswertung:

Es werden

- 20 aa) die Absorptionswerte (OD) des Gesamtprothrombins (Kavitäten mit anti Gesamt-Prothrombin mAK beschichtet),
- bb) der OD von Descarboxy-Prothrombin (Kavitäten mit anti-Descarboxy-Prothrombin mAK) und
- cc) der OD von carboxylierten Prothrombin (OD Gesamt-PT - OD Descarboxy-PT)
- 25 bestimmt.

Dann werden Eichkurven aus den gemessenen OD-Werten (siehe Fig. 1 - 3: Punkte A,B,C und D) der Kalibrierplasmen erstellt und der INR der Patientenplasmen berechnet.

30

10

Patentansprüche

1. Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten:

5

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

10

b1) Ermittlung einer ersten Konzentration (C1) an carboxyliertem Protein unter Verwendung eines ersten Antikörpers (A1) und Ermittlung einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2),

15

c) Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2) und

20

d) Korrelation des Quotienten (Q) mit dem Blutgerinnungsstatus.

2. Verfahren zur indirekten Bestimmung des Blutgerinnungsstatus mit folgenden Schritten:

25

a) Entnahme von Körperflüssigkeit, die ein durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbares Protein enthält,

30

b2) Ermittlung einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines dritten Antikörpers (A3) und Ermittlung

11

einer zweiten Konzentration (C2) an decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines zweiten Antikörpers (A2),

5 c1) Errechnung einer ersten Konzentration (C1) an carboxyliertem Protein gemäß folgender Beziehung:

$$C3 - C2 = C1$$

10 und Bildung eines ersten Quotienten (Q1) aus erster (C1) und zweiter Konzentration (C2)

oder

15 c2) Bildung eines zweiten Quotienten (Q2) aus dritter (C3) und erster Konzentration (C1) und

d) Korrelation des ersten bzw. zweiten Quotienten (Q1, Q2) mit dem Blutgerinnungsstatus.

20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Körperflüssigkeit Plasma, Blut, Speichel, Urin oder dgl. ist.

25 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung der ersten (C1), zweiten (C2) und/oder dritten Konzentration (C3) mittels eines enzym- oder fluoreszenz-immunologischen Verfahrens erfolgt.

30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als enzym-immunologisches Verfahren ELISA oder Strip-Assay verwendet wird.

12

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (C1), zweite (C2) und/oder dritte Konzentration (C3) und/oder der erste bzw. zweite Quotient (Q1, Q2) mittels einer Farbreaktion oder Fluoreszenzdetektion ermittelt wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das durch eine Vitamin-K abhängige γ -Carboxylase modifizierbare Protein Prothrombin, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

8. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur enzym-immunologischen Bestimmung einer ersten Konzentration (C1) der carboxylierten Form des Proteins ein erster Antikörper (A1) enthalten ist.

9. Kit nach Anspruch 8, wobei zur Bestimmung einer zweiten Konzentration (C2) der decarboxylierten Form des Proteins ein zweiter Antikörper (A2) enthalten ist.

10. Kit nach einem der Ansprüche 8 oder 9, wobei zur Bestimmung einer Gesamtkonzentration (C3) an carboxyliertem und decarboxyliertem Protein ein dritter Antikörper (A3) enthalten ist.

11. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei der erste (11) und der zweite Antikörper (12) jeweils auf einem separaten Feld eines Teststreifen aufgenommen sind.

13

12. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 11, wobei der dritte Antikörper (A3) auf einem Feld eines weiteren Teststreifens aufgenommen ist.

5 13. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 12, wobei jeweils ein zum ersten (A1) und zweiten Antikörper (A2) korrespondierendes Anti-Protein-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Protein-Fluoreszenz-Farbstoff-Konjugat enthalten ist.

10

14. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 13, wobei ein zum dritten Antikörper (A3) korrespondierendes Anti-Protein-Enzym-Konjugat oder ein Anti-Protein-Fluoreszenz-Farbstoff-Konjugat enthalten ist.

15

15. Kit nach einem der Ansprüche 8 bis 15, wobei das Protein Prothrombin, Nephrocalcin oder Osteocalcin ist.

20

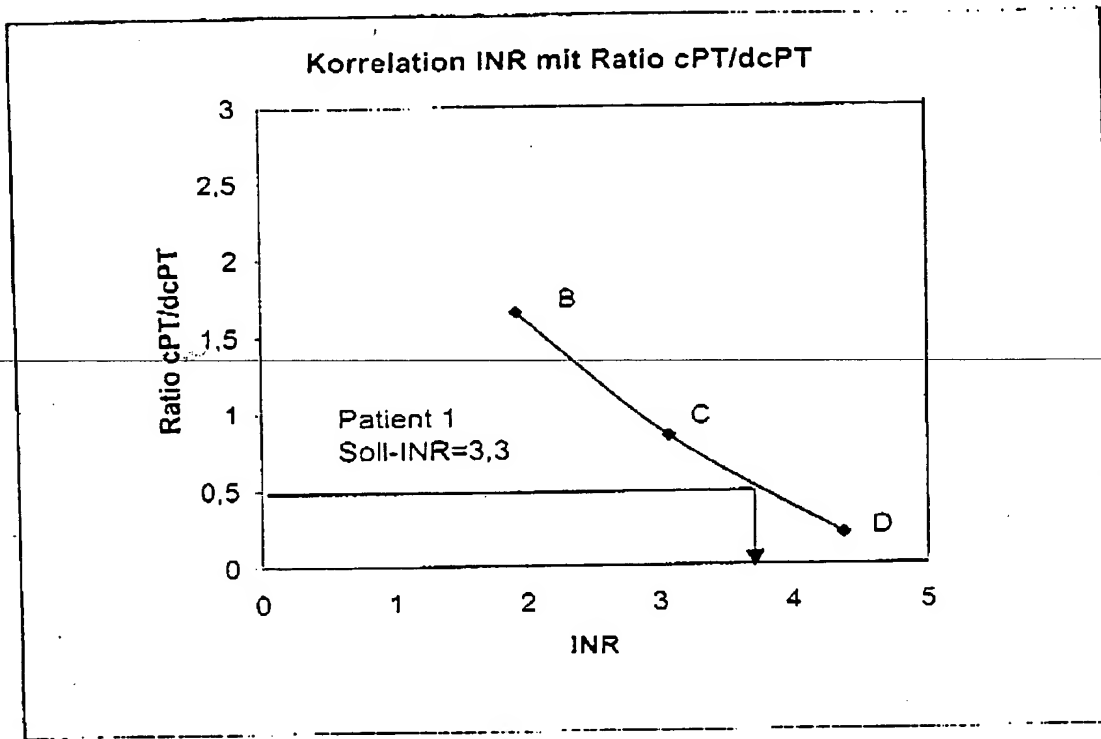


Fig. 1

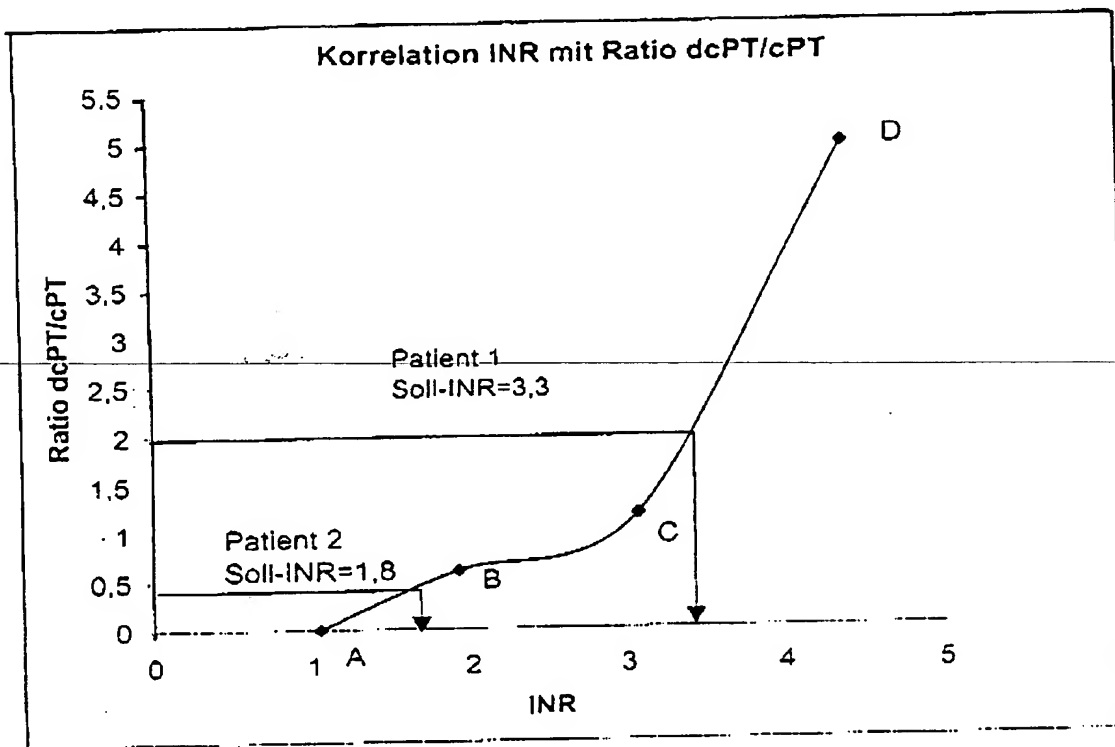


Fig. 2

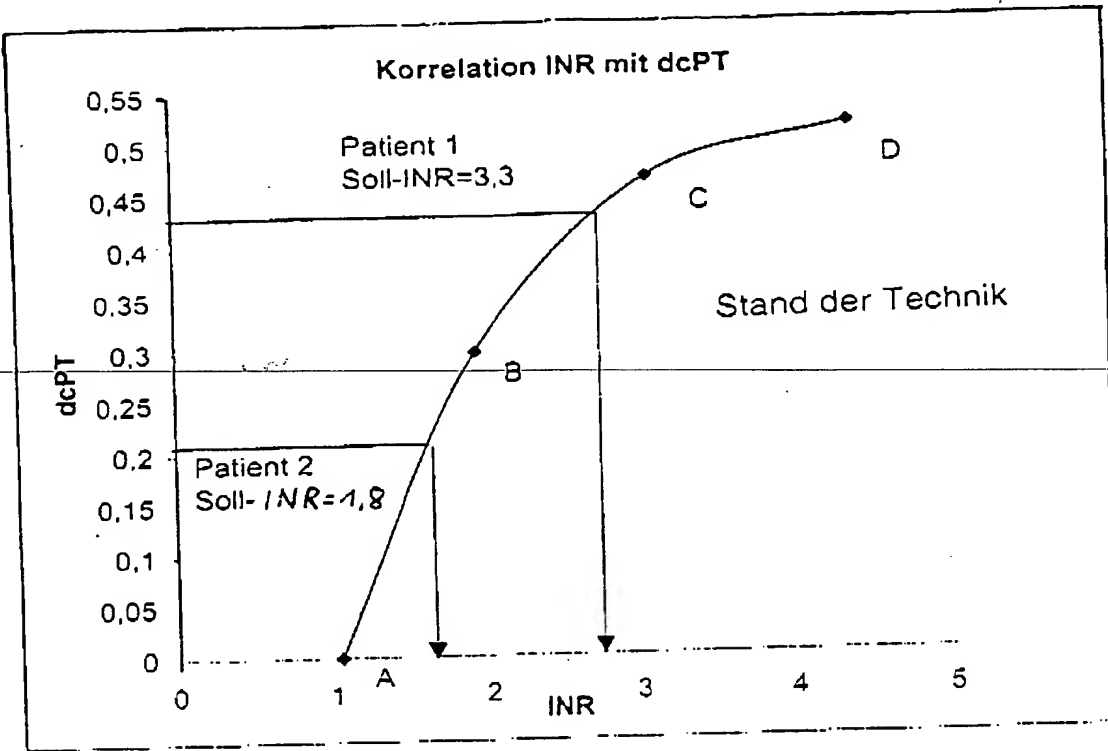


Fig. 3

14

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur indirekten Bestimmung des physiologischen Blutparameters mit folgenden

5 Schritten:

- a) Entnahme von Prothrombin enthaltender Körperflüssigkeit,
- 10 b1) Ermittlung einer ersten Konzentration an carboxyliertem Protein unter Verwendung eines ersten Antikörpers und Ermittlung einer zweiten Konzentration an decarboxyliertem Protein unter Verwendung eines zweiten Antikörpers,
- 15 c) Bildung eines ersten Quotienten aus erster und zweiter Konzentration und
- d) Korrelation des Quotienten mit dem physiologischen Blutparameter.

20